

# 국내산 다시마, 미역포자엽, 툃, 모자반 정제 fucoidan의 구성당 결합 특성

구재근  
한국식품개발연구원

## Structural Characterization of Purified Fucoidan from *Laminaria religiosa*, Sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Hizikia fusiforme* and *Sargassum fulvellum* in Korea

Jae-Geun KOO

Korea Food Research Institute, 46-1 Baekhyun Bundang, Kyunggi-Do 463-420, Korea

Primary structure of purified fucoidans was analysed by methanolysis, methylation and FT-IR measurement. Basic linkage in the fucoidans of *Laminaria religiosa*, sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Hizikia fusiforme* and *Sargassum fulvellum* from Korea was (1→3) linkage of fucose, but a considerable amount of (1→3) linked galactose was also found in case of the purified fucoidan from sporophylls of *U. pinnatifida*. Ester sulfate was substituted mainly to C-4 position of fucose and galactose.

**Key words :** primary structure, fucoidan, *Laminaria religiosa*, sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Hizikia fusiforme*, *Sargassum fulvellum*

### 서론

Fucoidan은 항혈액응고작용, 항암작용등 다양한 생리 가능성이 보고되어 있다 (Church et al, 1989; Yamamoto et al, 1981). 이들 생리가능성은 fucoidan의 조성 및 구조와 밀접한 상관성이 있어 fucoidan의 구조 연구는 생리작용 기작 연구 뿐아니라 fucoidan의 효율적 이용에도 매우 중요하다. Fucoidan의 결합 구조는 Conchie and Percival (1950)이 *Fucose vesiculosus*의 fucoidan을 methylation분석하여 주 결합이 (1→2) linked fucose이며 황산기는 C-4에 결합되어 있다고 최초 보고하였다. 이 후 Cote (1959)는 acetolysis를 통해 fucoidan 내에 (1→2) linked fucose이외에 (1→3) 및 (1→4) linked fucose도 존재한다고 보고하였고 Mian and Percival (1973)은 *Himanthalia lorea*와 *Bifurcaria bifurcata*로 부터 추출한 fucoidan을 methylation, periodate oxidation 및 partial hydrolysis를 통하여 주 결합이 (1→2) 및 (1→3) linked fucose이며 황산기는 C-4에 결합되어 있다고 하였다. 그러나 Nishino and Nagumo (1991)는 *Ecklonia kurome*의 fucoidan의 주 결합은 (1→3) linked fucose이고 황산기는 fucose의 C-4 위치에 결합되어 있다고 보고하였다. 이같은 구조의 차이는 fucoidan의 조성이 매우 복잡하기 때문으로 여겨지므로 정확한 구조를 알아내기 위해서는 보다 많은 구조

에 관한 연구가 필요하다고 여겨진다. 본 연구에서는 국내산 주요 갈조류에 함유되어 있는 fucoidan의 특성 조사 연구의 일환으로 전보 (Koo et al, 1995a; 1995b)에서 분리한 정제 fucoidan의 구조 분석을 하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재 료

전보 (Koo et al, 1995a, 1995b)에서 정제한 다시마, 미역포자엽, 툃, 모자반의 정제 fucoidan을 사용하였다.

#### 2. Methanolysis

정제 fucoidan 44.9 mg에 91 mM metanolic HCl를 가하여 실온에서 24시간 methanolysis하였다. 원심분리 (3,000 g×10 min)하여 상등액을 Sephadex G-25 칼럼 (2.0×100 cm)에 주입한 후 증류수를 흘리면서 fraction collector로 4.8 ml씩 모은 후 페놀-황산법으로 480 nm에서 흡광도를 측정하여 고분자 획분 (test tube No. 10~15)을 얻었다. 이를 다시 DEAE-Sephadex A-25칼럼 (Cl form, 2.0×30 cm)에 주입한 후 증류수를 흘려 고분자 중성획분 (3.5 mg)을 분획하여 methylation 분석시료로 사용하였다 (Nishino and Nagumo, 1991).

3. Methylation analysis

정제 fucoidan과 methanolysis를 하여 얻은 고분자 중 성획분을 각각 Taylor and Conrad (1972) 및 Anderson and Stone (1985)의 방법에 따라 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide-metho-p-toluene sulfonate로 uronic acid를 환원한 후 각각 2mg을 취해 Kvernheim (1987)과 Harris et al (1984)의 방법에 따라 N-butyllithium (2.5 M in hexane)과 methyl iodide으로 methylation하였다. 이를 Nishino and Nagumo (1991)의 방법에 따라 2단계 가수분해한 후 NaBD4로 환원한 뒤 ethyl acetate, acetic anhydride 및 70% perchloric acid로 acetylation하였다. Partially O-methylated alditol acetate의 정량은 BP-1 (0.22 mm i.d.×30 m; film thickness 0.25 μm) 칼럼을 부착한 GC (Hewlett Packard GC Model 5890)로 칼럼온도 120°C-2.0°C/min-210°C-10.0°C/min-270°C, 시료 주입구 및 검출기 온도 270°C 조건에서 FID로 검출하여 피크 면적을 구한후 response factor (Sweet et al., 1975)를 이용하여 mol %로 나타내었다. 또한 partially O-methylated alditol acetate 동정은 retention time (Lomax et al, 1985) 및 Concept 11 GC/MS (Kratos Analytical

Manchester, UK)로 electron impact (EI) mode에서 70 eV로 이온화 하여 확인하였다.

4. FT-IR (Fourier transform Infrared Spectrophotometer) 스펙트럼의 측정

정제한 fucoidan의 황산기등 주요 관능기의 특성을 조사하기 위하여 KBr pellet형태로 시료를 조제하여

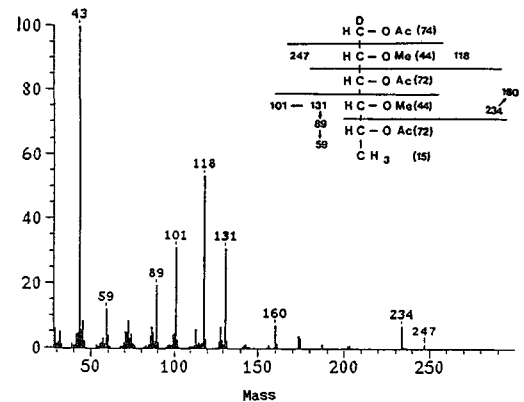


Fig. 1. Mass spectrum of 1,3,5-tri-O-acetyl-(1-deuterio)-2,4-di-O-methyl-fucitol.

Table 1. Methylation analysis of purified fucoidans

Methylated sugars	Mole, %				Major mass spectral fragment ions (m/z)						
	Lar <sup>1</sup>	Und <sup>2</sup>	Hij <sup>3</sup>	Sar <sup>4</sup>	175,	162,	131,	118,	102,	89,	
2,3,4-tri-O-methyl-Fuc	11.2	9.5	9.7	15.3	175,	162,	131,	118,	102,	89,	
2,4-di-O-methyl-Fuc	38.8	35.7	32.1	37.4	247,	234,	160,	131,	118,	101,	89
2-O-methyl-Fuc	17.7	7.4	16.9	22.6	275,	173,	160,	129,	118,	113,	87
4-O-methyl-Fuc	7.7	9.5	12.0	4.2	262,	202,	188,	143,	131,	113,	87
2,3,4,6-tetra-O-methyl-Gal	2.0	2.1	5.1	3.1	205,	161,	145,	129,	118,	102,	87
2,3,6-tri-O-methyl-Gal	16.3	15.0	9.9	10.1	233,	162,	129,	118,	113,	102,	87
2,4,6-tri-O-methyl-Gal	5.3	19.3	8.5	4.5	234,	161,	143,	129,	118,	101,	86
2,4-di-O-methyl-Gal	1.0	1.4	5.8	2.9	234,	189,	127,	118,	98,	87,	72

<sup>1</sup> *Laminaria religiosa*

<sup>2</sup> *Sporophylls of Undaria pinnatifida*

<sup>3</sup> *Hijikia fusiforme*

<sup>4</sup> *Sagassum fulvellum*

Table 2. Methylation analysis of high molecular fractions of purified fucoidans obtained by methanolysis

Methylated sugars	Mole, %		Major mass spectral fragment ions (m/z)							
	Lar <sup>1</sup>	Und <sup>2</sup>	175,	162,	131,	118,	102,	89,	101,	89
2,3,4-tri-O-methyl-Fuc	12.9	8.5	175,	162,	131,	118,	102,	89,		
2,4-di-O-methyl-Fuc	59.2	54.5	247,	234,	160,	131,	118,	101,	89	
2-O-methyl-Fuc	3.0	1.5	275,	173,	160,	129,	118,	113,	87	
4-O-methyl-Fuc	7.0	2.3	262,	202,	188,	143,	131,	113,	87	
2,3,4,6-tetra-O-methyl-Gal	6.3	5.3	205,	161,	145,	129,	118,	102,	87	
2,3,6-tri-O-methyl-Gal	10.5	9.9	233,	162,	129,	118,	113,	102,	87	
2,4,6-tri-O-methyl-Gal	5.3	18.5	234,	161,	143,	129,	118,	101,	86	
2,4-di-O-methyl-Gal	0.2	4.6	234,	189,	127,	118,	98,	87,	72	

<sup>1</sup> *Laminaria religiosa*

<sup>2</sup> *Sporophylls of Undaria pinnatifida*

FT-IR (BRUKER, IFS66)을 이용하여 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. Methylation analysis

Table 1은 다시마, 미역포자엽, 툫, 모자반 정제 fucoidan의 methylation 분석 결과이며 Fig. 1은 주요 성분인 1,3,5-tri-O-acetyl- (1-deuterio)-2,4-di-O-methyl fucitol의 mass spectrum이다. 다시마는 2,4-di-O-methyl-Fuc (38.8%), 2-O-methyl-Fuc (17.7%), 2,3,6-tri-O-methyl-Gal (16.3%) 순으로 함량이 높았으며 미역포자엽은 2,4-di-O-methyl-Fuc (35.7%), 2,4,6-tri-O-methyl-Gal (19.3%), 2,3,6-tri-O-methyl-Gal (15.0%)순으로, 툫은 2,4-di-O-methyl-Fuc (32.1%), 2-O-methyl-Fuc (16.9%), 4-O-methyl-Fuc (12.0%) 순으로 그리고 모자반은 2,4-di-O-methyl-Fuc (37.4%), 2-O-methyl-Fuc (22.6%), 2,3,4-tri-O-methyl-Fuc (15.3%) 순으로 함량이 높았다. 따라서 툫, 모자반 및 다시마에서 정제한 fucoidan의 주 결합 형태는 3-O-linked fucose와 3,4-O-disubstituted fucose이며 미역포자엽은 주 결합인 3-O-linked fucose이외에 3-O-linked galactose와 4-O-linked galactose도 상당량 존재함을 알 수 있었다.

Table 2는 다시마와 미역포자엽 정제 fucoidan내의 황산기의 결합 위치를 조사하기 위해 methanolysis를 하여 분획한 고분자 획분의 methylation 분석 결과이다. 다시마, 미역포자엽 모두 Table 1에 비해 2,4-di-O-methyl-Fuc의 함량이 증가한 반면 2-O-methyl-Fuc가 감소하였다. 그리고 미역포자엽은 4-O-methyl-Fuc도 감소하였다. 이는 다시마, 미역포자엽 모두 fucose의 C-4위치에 황산기가 주로 결합되어 있고 또한 미역포자엽에는 C-2에도 황산기가 결합되어 있을 것으로 여겨진다. 또한 galactose도 정제 fucoidan에 비해 2,3,6-tri-O-methyl-Gal의 함량이 감소한 반면 상대적으로 2,3,4,6-tetra-O-methyl-Gal의 함량이 증가하였음을 알 수 있다. 따라서 galactose에도 C-4번 위치에 대부분의 황산기가 결합되어 있을 것으로 추정된다.

이는 기존의 fucoidan 기본구조가 (1→2) linked fucose라는 Conchie and Percival (1950)의 보고와 달랐으나 *E. Kurome*의 fucoidan 중 항혈액응고능이 우수한 획분의 주 결합구조가 (1→3) linked fucose이며 황산기의 대부분은 4번탄소 위치에 결합되어 있다는 보고 (Nishino and Nagumo, 1991)와 유사하였다.

#### 2. FT-IR 측정

다시마, 미역포자엽, 툫, 모자반 정제 fucoidan을 FT-IR

측정한 결과 전 시료 모두 1240과 850  $cm^{-1}$  부근에 강한 흡수 band가 나타났다. Fig. 2는 대표적으로 다시마의 FT-IR spectrum을 나타낸 것으로 1240과 850  $cm^{-1}$  부근의 강한 흡수 band는 각각 S=O와 C-O-S결합을 나타낸다. 특히 850  $cm^{-1}$ 는 C-O-S가 axial position에 결합되어 있음을 나타내는 것으로 정제 fucoidan의 대부분의 황산기가 C-4위치에 결합되어 있음을 알 수 있다 (Anno et al, 1966; Nishino, 1989).

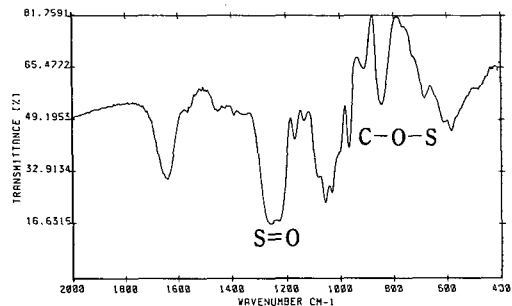


Fig. 2. FT-IR spectrum of purified fucoidan of *Laminaria religiosa*.

### 요 약

국내산 주요 갈조류인 미역, 다시마, 툫, 모자반 정제 fucoidan의 기본 결합 구조 및 황산기 결합 위치를 확인하기 위하여 정제 fucoidan 및 이를 methanolysis하여 얻은 고분자 획분을 각각 methylation 및 FT-IR 측정을 하였다.

다시마, 툫, 모자반, 미역포자엽 정제 fucoidan의 주 결합은 (1→3) linked fucose였으며 미역포자엽에는 (1→3) linked galactose도 상당량 존재하였다. 황산기의 대부분은 fucose와 galactose의 C-4 위치에 결합되어 있는 것으로 추정된다.

### 참 고 문 헌

Anderson, M.A. and B.A. Stone. 1985. A Radiochemical approach to the determination of carboxylic acid groups in polysaccharides. *Carbohydr. Polym.*, 5, 115.  
 Anno, K., H. Terahata, Y. Hayashi, and N. Seno. 1966. Isolation and purification of fucoidan from brown seaweed *Pelvetia wrightii*. *Agr. Biol. Chem.*, 30, 495.  
 Church, F.C., J.B. Meade, R.E. Treanor, and H.C. Whinna. 1989. Antithrombin activity of fucoidan. *J. Biol. Chem.*, 264, 3618.  
 Conchi, J. and E.G.V. Percival. 1950. Fucoidan part II.

- The hydrolysis of a methylated fucoidan prepared from *Fucus Vesiculosus*. J. Chem. Soc., 827.
- Cote, R.H. 1959. Disaccharides from fucoidin. J. Chem. Soc., 2248.
- Harris, P.J., R.J. Henny, A.B. Blakeney, and B.A. Stone. 1984. An Improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. Carbohydr. Res., 127, 59.
- Koo, J.G., K.S. JO, J.R. Do, and S.J. Woo. 1995a. Isolation and purification of fucoidans from *Laminaria religiosa* and *Undaria pinnatifida* in Korea. Bull. Korean Fish. Soc., 28, 227.
- Koo, J.G., Jo, K.S., Do, J.R., Park, J.H. and C.B. Yang. 1995b. Chemical properties of fucoidans from *Hizikia fusiformis* and *Sargassum fulvellum*. Bull. Korean Fish. Soc., 28, 659.
- Kvernheim, A.L. 1987. Methylation analysis of polysaccharides with butyllithium in dimethyl sulfoxide. Acta. Chem. Scand. Ser. B, 41, 150.
- Lomax, J.A., A.H. Gordon, and A. Chesson. 1985. A multiple-column approach to the methylation analysis of plant cell-walls. Carbohydr. Res., 138, 177.
- Mian, A.J. and E. Percival. 1973. Carbohydrates of the brown seaweeds *Himantalia lorea*, *Bifucaria bifurcata*, and *Padina pavonia* part II. structural studies of the fucan. Carbohydr. Res., 26, 147.
- Nishino, T., G. Yokoyama, K. Dobashi, M. Fujihara, and T. Nagumo. 1989. Isolation, purification, and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities. Carbohydr. Res., 186, 119.
- Nishino, T. and T. Nagumo. 1991. Structural characterization of new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. Carbohydr. Res., 211, 77.
- Sweet, D.P., R.H. Shapiro, and P. Albersheim. 1975. Quantitative analysis by various g.l.c. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. Carbohydr. Res., 40, 217
- Tayer, R.T. and H.E. Conrad. 1972. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. Biochemistry, 11, 1383.
- Yamamoto, I., T. Nagumo, M. Takahasi, M. Fujihara, Y. Suzuki, and I. Iizima. 1981. Antitumor effect of seaweeds III. antitumor effect of an extract from *Sargassum Kjellmanianum*. J. Exp. Med., 51, 187.

---

1996년 8월 26일 접수

1997년 1월 4일 수리